

氏 名	井 内 武 和
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 5 9 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 0 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	Adjuvant effect of anti-4-1BB mAb administration in adoptive T cell therapy of cancer  (T cell を用いた養子免疫療法における抗 4-1BB モノクローナル抗体の補助効果)
審 査 委 員	主 査 教 授 小 笠 原 一 誠 副 査 教 授 清 水 猛 史 副 査 教 授 藤 山 佳 秀

## 論文内容要旨

※整理番号	564	(ふりがな) 氏名	いうちたけかず 井内武和
学位論文題目	<b>Adjuvant effect of anti-4-1BB mAb administration in adoptive T cell therapy of cancer</b> (T cell を用いた養子免疫療法での抗 4-1-BB モノクローナル抗体の補助効果)		
<p>(目的)</p> <p>抗 4-1BB モノクローナル抗体は、化学療法や DC ワクチンの治療効果を増強する補助薬としての可能性が示唆されているが、T cell を用いた養子免疫療法においては明らかではない。今回は抗 4-1BB 抗体が T cell を用いた養子免疫療法において抗腫瘍効果を増強することを示し、その機序を明らかにすることを目的とし以下の実験を行った。</p> <p>(方法)</p> <p>肉腫の細胞株である MCA205 をマウスの尾静脈から静脈注射することで肺転移をつくった後に、癌抗原に感作させた同種リンパ球を移植し、インターロイキン 2 を腹腔内投与した。このマウスを抗 4-1BB 抗体を投与する群とコントロール群とにわけ、治療後の肺転移の数を比較することによってマウス生体での抗 4-1BB 抗体の抗腫瘍効果を検証した。</p> <p>また、この肺転移マウスに抗 NK 細胞抗体を投与することによって生体内の NK 細胞を除去し、抗 4-1BB 抗体の作用に NK 細胞が関与するかどうかを検証した。</p> <p>抗 4-1BB 抗体の移植リンパ球の延命作用を検証するため、CD45.1 をもったマウスから採取した腫瘍感作リンパ球を CD45.2 の同種マウスに移植した。抗 4-1BB 抗体投与後にマウスの血中と脾臓に含まれる移植リンパ球の数をそれぞれ flow cytometry を用いて経時的に測定した。</p> <p>抗 4-1BB 抗体のシグナル経路に STAT 4 が含まれるかどうかを検証する目的で、STAT4 ノックアウトマウスとコントロールマウスから採取した腫瘍感作リンパ球をそれぞれ <i>in vitro</i> で培養し、腫瘍反応性に分泌されるインターフェロン<math>\gamma</math> の分泌量を ELISA 法で比較した。また、このノックアウトマウスのリンパ球を肺転移マウスに移植し、抗 4-1BB 抗体を投与した時の治療効果の変化をコントロールと比較することで、STAT4 がマウス生体での抗 4-1BB 抗体の効果発現に関与しているかどうかを調べた。</p> <p>(結果)</p> <p>リンパ球の移植のみ、あるいは抗 4-1BB 抗体の投与のみでは肺転移マウスに対する抗腫瘍効果は認められなかったが、リンパ球移植と抗 4-1BB 抗体を併用することで肺転移の数は有意に減少</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

した。また、この効果は抗 4-1BB 抗体を増量することで著明に増強された。

肺転移マウスの NK 細胞を抗 4-1BB 抗体投与前に除去すると、抗 4-1BB 抗体による抗腫瘍効果は NK 細胞を除去しない群に比べ減弱した。

マウスに移植されたリンパ球の数は、脾臓中、血中ともに投与翌日から日を経るに従って減少した。脾臓中の移植リンパ球数は抗 4-1BB 抗体投与群では 4 日目に非投与群よりも有意に多くなり、9 日目には差がなくなった。血中では 9 日目に投与群の移植リンパ球数が非投与群よりも有意に多くなった。

腫瘍感作リンパ球の腫瘍抗原に反応したインターフェロンの分泌は、リンパ球培養時に抗 4-1BB 抗体を使用することによって有意に増加した。一方、STAT4 ノックアウトマウスの腫瘍感作リンパ球ではインターフェロンの分泌量は減少しており、抗 4-1BB 抗体を使用しても有意な分泌量の増加はみられなかった。STAT4 ノックアウトマウスの腫瘍感作リンパ球を移植した肺転移マウスの治療では、野生型マウスのリンパ球を使用したときにみられた抗 4-1BB 抗体投与による抗腫瘍効果の増強作用がみられなかった。

#### (考察)

今回の実験で、T 細胞を用いた癌の養子免疫治療でも抗 4-1BB 抗体投与が抗腫瘍効果を増強させることが判明し、その効果の一部は NK 細胞を介していることが示唆された。他の実験系で抗 4-1BB 抗体によって NK 細胞が T 細胞の増殖を促進し、あるいは腫瘍へ浸潤する NK 細胞が増えるという報告があるが、今回の報告では T 細胞を用いた養子免疫療法において、抗 4-1BB モノクローナル抗体による抗腫瘍効果の一部が NK 細胞のどのような機序を介して発現しているかは明らかにできていない。

以前の我々の *in vitro* の実験で、抗 4-1BB 抗体によって Bcl-2 と Bcl-xL の発現が増加することが判明している。今回の実験で抗 4-1BB 抗体が移植されたリンパ球の減少速度を緩めていることがわかったが、前記のような発現が増えているのか、あるいは、リンパ球の増殖を促進しているのかは明らかではない。また、腫瘍特異的なリンパ球の変化も興味深いところである。

STAT4 の関与が今回の実験で示唆されたが、ドナーとレシピエントのどちらのリンパ球の STAT4 が関与しているのかは今回の実験では明らかになっていない。野生型とノックアウトマウスそれぞれのリンパ球を交互に移植することによってその点は解明できるであろう。

#### (結論)

抗 4-1BB 抗体は T 細胞による養子免疫治療の抗腫瘍効果を増強し、その効果は抗 4-1BB 抗体の投与量を増やすことによって増強された。抗 4-1BB 抗体の投与によって腫瘍反応性のインターフェロンの分泌が増加すること、移植された感作リンパ球を長期に生存させることがこの効果の機序の一部であると考えられる。この作用の一部はホストの NK 細胞を介して発現していると考えられ、また、STAT4 がシグナル経路として含まれていることが明らかになった。

### 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	564	氏名	井内武和
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>活性化された T 細胞や NK 細胞に発現する 4-1BB に着目し、抗 4-1BB モノクローナル抗体の投与による養子免疫治療の抗腫瘍効果に関する研究が行われた。</p> <p>その結果 1) 担癌マウスに対する T 細胞を用いた養子免疫治療において、抗 4-1BB モノクローナル抗体は用量依存性に治療効果を増強した 2) ホストの NK 細胞を消失させることによりその効果は減弱した 3) 抗 4-1BB 抗体によって末梢血中および脾臓中の移植された T 細胞の減少が抑制された 4) STAT4 ノックアウトマウスを使うことにより、抗 4-1BB 抗体の投与によって得られたインターフェロン<math>\gamma</math>の増加と治療効果の増強作用は STAT4 ノックアウトマウスを使うことによって消失した</p> <p>以上の結果から、抗 4-1BB モノクローナル抗体は養子免疫治療における補助療法として有効であると考えられ、また、その作用機序の一部が明らかになった。この研究は癌の免疫療法の開発に有用かつ今後の発展性も期待され、博士(医学)の学位論文に値するものと認める。</p>			
<p>(平成 30 年 2 月 25 日)</p>			